

氏名	じょんひて 鄭喜太
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第350号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Analysis of <i>msa1</i> and <i>msa2</i> that Negatively Control Sexual Differentiation in Fission Yeast (分裂酵母の有性生殖過程への移行を負に制御する <i>msa1</i> と <i>msa2</i> の解析)
学位論文審査委員	(主査) 川向 誠 (副査) 松田英幸 中川 強 山田 守 山野好章

学位論文の内容の要旨

Sexual differentiation of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is triggered by nutrient starvation and by the presence of mating pheromones. Fission yeast cells initiate mating with opposite mating-type cells, and subsequently undergo karyogamy, pre-meiotic DNA synthesis, meiosis I, meiosis II, and then form ascospores. Fission yeast serves an excellent model system to understand these complicated processes of sexual differentiation.

In the previous study, Katayama *et al.* developed nine distinguishable hypersporulating *S. pombe* mutants called sporulation abnormal mutant (*sam1*) 1-*sam9*. These mutants are initially characterized as to sporulate on nutrient-rich medium. For further study of regulatory mechanism in sexual differentiation, the author isolated two genes (*msa1* and *msa2*) as multicopy suppressors of *sam1* and analyzed. Latterly, *msa2* was turned out to be identical with *nrd1*.

The author describes that the *msa1* gene controlled sexual differentiation through inhibition of transcription of meiosis-inducing genes such as *stell*. *msa1* encodes a 533-aa putative RNA-binding protein whose main function is to negatively regulate sexual differentiation. Disruption of the *msa1* gene caused cells to hypersporulate. Intracellular levels of *msa1* RNA and Msa1 protein diminished after several hours of nitrogen starvation.

Genetic analysis suggested that the function of *msa1* is independent of the cAMP pathway and stress responsive pathway. When the expression of *mei2*, *rep1*, *ste11*, and *mam2* were tested in wild type and *msa1Δ* cells by Northern blot analysis, expression of both *mam2* and *rep1* was found to be markedly higher and faster in *msa1Δ* cells than in wild-type cells. Deletion of the *ras1* gene in diploid cells are known to inhibited sporulation and decreased expression of mating pheromone-induced genes such as *mam2*; simultaneous deletion of *msa1* reversed both phenotypes. Overexpression of *msa1* decreased expression of *mam2* induced by activated Ras1^{Val17}. Phenotypic hypersporulation was similar between cells with deletion of only *rad24* and both *msa1* and *rad24*, but simultaneous deletion of *msa1* and *msa2* additively increased hypersporulation. The primary function of Msa1 is to negatively regulate sexual differentiation by controlling the expression of Ste11-regulated genes, possibly through the pheromone-signaling pathway.

The author describes the function of the *msa2* gene and the relationship between *msa2* and *cpc2*. Msa2/Nrd1 was characterized as a factor that block the onset of sexual differentiation. Using the yeast two-hybrid system, the author identified Cpc2, a fission yeast homologue of the RACK1 protein, which interacted with Msa2/Nrd1, and confirmed Msa2/Nrd1 in fact interacted with Cpc2 in *S. pombe* cells. Epistatic analysis of *msa2/nrd1* and *cpc2* suggested that Msa2/Nrd1 is an upstream regulator for Cpc2. Localization analysis of Cpc2 and Msa2/Nrd1 indicated both proteins predominantly localized in the cytoplasm. The interaction of a negative regulator Msa2/Nrd1 with the positive regulator Cpc2 suggested a new regulatory circuit in the sexual differentiation of *S. pombe*.

In this thesis, the author characterized two genes (*msa1* and *msa2*) both of which encode RNA binding protein and their main functions are negative regulation of sexual differentiation. Together with the already known RNA binding protein such as Mei2 and Sla1 involved in sexual differentiation in fission yeast, the analysis of Msa1 and Msa2 predict the important rules of RNA binding proteins in the complicated processes of sexual differentiation.

論文審査の結果の要旨

分裂酵母は栄養源の欠乏及び性フェロモンの刺激によって体細胞有糸分裂から減数分裂へ移行する有性生殖過程を開始する。異なる接合型の細胞が接合し、核融合後、一度 DNA 合成を行ってから二回の減数分裂後、胞子を形成する。分子生物学的手法がとりやすい分裂酵母は有性生殖過程の基本的メカニズムを研究するのに良いモデル生物である。

以前、片山らは栄養が豊富な条件下でも異常に胞子形成が昂進する九つの変異株 (*sam1-9*) を単離し、部分的にその機能を調べていた。本研究では分裂酵母の有性生殖過程の制御機構を研究するために、*sam1* 変異株のサプレッサーとして *msa1* と *msa2* を単離し解析した。

減数分裂課程を誘導する因子の転写量を抑制することで有性生殖課程を抑制している *Msa1* は 533 アミノ酸からなる推定 RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子である。*Msa1* を破壊すると非常に減数分裂が昂進することから有性生殖課程を負に抑制していることが分かった。*Msa1* の mRNA とタンパク質挙動を調べた結果、窒素源枯渇によってその発現量が減少していた。*Msa1* は cAMP 経路とストレス応答経路とは機能的に独立していることが分かった。ノーザン解析を用いて野生株と *msa1* 破壊株で *mei2*, *repl*, *stell*, *mam2* の転写発現レベルを調べた結果、*msa1* 破壊株では野生株と比べて *mam2* と *repl* の発現が著しく増加した。

フェロモンシグナル経路との関わりを調べるために、フェロモン経路に働いている因子との二重破壊株を作製し表現型を見た結果、*res1* 欠損の胞子形成不能が *msa1* との二重変異株の二倍体で回復された。また *Ras1* の活性化変異株 (*ras1^{val17}*) による *mam2* の発現誘導が *msa1* の大量発現によって著しく抑制された。*msa1* と *msa2* との関連性を調べた結果、*msa1* は *msa2* とは独立的に機能していることが分かった。これらのことから *msa1* の主な役割は *Stell* から転写誘導される因子の発現を抑制することで有性生殖過程の移行を負に制御していることであると考えた。

次に同じく RNA 結合タンパク質をコードする *msa2* 遺伝子に関する解析を進めた。*Msa2* は有性生殖課程の開始を抑制する因子 *Nrd1* として単離されたものと同一である。*Msa2* と相互作用する因子として RACK1 蛋白質のホモログである *Cpc2* をイースト 2-ハイブリッド・システムを用いた実験で単離した。さらに *Msa2/Nrd1* と *Cpc2* の相互作用を *in vivo* で確認した。*Msa2/nrd1* と *cpc2* の上下関係を遺伝学的に解析した結果、*Msa2/Nrd1* が *Cpc2* の上流因子である可能性を示唆した。*Cpc2* および *Msa2/Nrd1* の細胞内での局在を調べた結果、両方の蛋白質は主に細胞質に局在した。負の制御因子である *Msa2/Nrd1* が正の制御因子 *Cpc2* と相互作用していることは分裂酵母の有性生殖過程の制御における新しい制御機構を示唆している。

これらの結果から *Msa1* と *Msa2* と命名した二つの RNA 結合タンパク質が主に有性生殖過程を負に制御する因子であることを見出し *Msa1* の作用点はまだ不明であるが *Msa2* は *Cpc2* と相互作用することを見出した。

これまでに *Msa2* や *Slal* など RNA 結合タンパク質が減数分裂課程に重要な役割を果たすことが知られており、今回の発見は有性生殖課程において RNA 結合タンパク質は様々な局面で制御因子として働き、RNA 結合タンパク質の重要性をさらに高めた研究成果である。